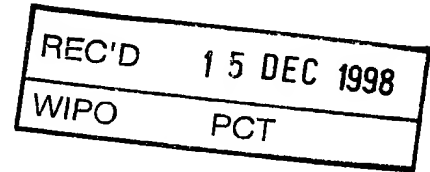


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DE 98 / 02896

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

41

Bescheinigung

Die Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch Professor
Dr. R. Kurth Robert-Koch-Institut, in Berlin/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen,
monoklonale Antikörper sowie die Herstellung
und deren Verwendung"

am 23. September 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die Anmelderangaben wurden berichtet in:
Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den
Direktor des Robert Koch Instituts, in Berlin/Deutschland.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 26. Oktober 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 197 41 929.1



Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die

5 Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist. Ferner betrifft die Erfindung

10 die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von

15 Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.

Neue Deutsche Patentanmeldung

"Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung"

5 Anmelder: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch Prof. Dr. R. Kurth
Unser Zeichen: 169-1

Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Substanzen zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten und zur
20 Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
25 Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Insbesondere betrifft die Erfindung die Diagnose mittels eines ELISA-Nachweises, einer Durchflußzytometrie, eines Western Blot, eines
30 Radioimmunnachweises, einer Nephelometrie oder einer histochemischen Anfärbung.

T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen, das von "Antigen-präsentierenden Zellen", z.B. dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen, dargeboten wird, durch ihren T-Zell-Rezeptor. Die Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor alleine aber reicht in den meisten Fällen
35 nicht aus, um T-Lymphozyten ausreichend zu aktivieren. Hierzu bedarf es der zusätzlichen, gleichzeitigen Stimulation (nachfolgend auch "Ko-Stimulation" genannt) durch andere

Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der T-Lymphozyten. Eines dieser Rezeptormoleküle ist der sogenannte CD28-Rezeptor, der durch das ko-stimulierende Molekül B7 stimuliert wird. Werden diese "ko-stimulatorischen" Moleküle, z.B. CD28, wirksam, so erreicht die Aktivierung der T-Zellen nach der Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor ein ausreichendes Niveau.

5 Nach einer solchen vollständigen Aktivierung exprimiert die T-Zelle zusätzliche Moleküle, z.B. CD25, CD69, CD71, auf der Oberfläche und synthetisiert zahlreiche Zytokine, z.B. IL-2 und IFN- γ , welche die Funktion von Botenstoffen haben. Sowohl diese zusätzlichen Oberflächenmoleküle wie auch die Zytokine dienen dem Informationsaustausch der T-Zelle mit anderen Zellen des Immunsystems. Durch die zusätzlichen Oberflächenmoleküle und die Zytokine

10 lenken die aktivierten T-Zellen die gesamte Antigen-spezifische Immunabwehr. Auf diese Weise wird sowohl die Generierung von zytotoxischen Zellen ("Killerzellen") wie auch die Generierung von Antigen-spezifischen Antikörpern durch B-Zellen gesteuert. Zytotoxische Zellen wie auch die spezifisch gebildeten Antikörper eliminieren virale oder bakterielle Erreger, welche in den Körper eindringen. In einigen Fällen kommt es jedoch zu einem Überschießen der Immunreaktion und das

15 Immunsystem richtet sich gegen die eigenen Körperzellen. Das führt zum Auftreten von "Autoimmunerkrankungen", z.B. zu rheumatoider Arthritis, Morbus Bechterew, Sjögren-Syndrom, Colitis ulcerosa, u.a. Einer der wesentlichen Orte der Kooperation zwischen Antigen-aktivierten T-Zellen und anderen Zellen des Immunsystems sind die sekundären lymphatischen Organe, darunter die Tonsillen. Hier werden die T-Lymphozyten durch das von dendritischen

20 Zellen präsentierte Antigen aktiviert, hier interagieren T-Lymphozyten mit B-Zellen. Aufgrund dieser Interaktion sezernieren B-Zellen nach mehreren Zwischenstufen der Differenzierung Antigen-spezifische Antikörper vom IgM- und IgG-Typ.

25 Das am besten charakterisierte und bisher mit wirksamste ko-stimulatorische Molekül ist das CD28-Oberflächenmolekül (nachstehend CD28-Rezeptor oder CD28 genannt), das auf einem großen Teil der T-Zellen konstitutiv exprimiert wird. *In vitro* führt die Ko-Stimulation durch CD28 nach Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor zu einer sehr starken Erhöhung der Zytokin-Sekretion von z.B. IL-2 und IFN- γ wie auch zu einer deutlichen Heraufregulation der Expression von Zelloberflächen-Molekülen wie CD25, CD69, CD71, welche für die Interaktion

30 der T-Zellen mit anderen Immunzellen, z.B. B-Lymphozyten, notwendig sind; vgl. Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404. Durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor läßt sich des weiteren die Proliferation der T-Lymphozyten deutlich steigern. Auch wird durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor die T-Zell-Steuerung der B-Lymphozyten-Funktion so optimiert, daß es zu einer erhöhten Sekretion von Antikörpern kommt

Wenn die Funktion des CD28-Rezeptors aufgehoben wird, kommt es zu einer drastischen Funktionseinbuße der Immunabwehr. Das konnte anhand einer transgenen Maus gezeigt werden, in der das CD28-Gen durch homologe Rekombination zerstört wurde (ein sogenannter "CD28-knock-out"). Die auf diese Weise gestörte Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen führt zu einer fehlenden Ko-Stimulation. Diese wiederum führt zu einer Störung der T-Zell-Funktion, d.h. zu einer verminderten Proliferation der T-Zellen und zu einer drastisch verminderten Synthese verschiedener Zytokine. Die fehlende Ko-Stimulation führt letztendlich zu einer verminderten Funktion der Antigen-spezifischen Immunabwehr. So wird u.a. durch das Fehlen von CD28 die Bildung Antigen-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper durch B-Lymphozyten auf 10% des Normwertes reduziert; vgl. Shahinian et al., *Science* 262 (1993), 609-612; Lucas et al. *Journal of Immunology* 154 (1995), 5757-5768.

Über eine Ko-Stimulation durch CD28 kann man *in vitro* auch das Eindringen des Aids-Virus in T-Lymphozyten verhindern; vgl. Riley et al., *Journal of Immunology* 158 (1997), 5545-5553. Entsprechende Versuche sind *in vivo* noch nicht durchgeführt worden. Bekanntlich schaltet CD28 viele Zytokin-Gene an, die *in vivo* zu erheblichen Nebenwirkungen führen können. Die Blockade der Rezeptoren von CD28 durch ein lösliches CTLA-4-Immunglobulin-Molekül ist in Affenmodell erfolgreich eingesetzt worden, um die Abstoßung von transplantierten Nieren zu verhindern. Hierbei wurde CTLA-4 in Kombination mit einem Antikörper gegen das CD40-Liganden-Molekül eingesetzt worden; vgl. Kirk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8789-8794. Die Blockade der CD28-Rezeptoren betrifft jedoch sämtliche T-Lymphozyten und nicht nur die bereits aktivierten, da CD28 auf T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird.

Es besteht somit ein Bedarf an einem ko-stimulierenden Oberflächenmolekül, das nur auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist, bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Substanzen, z.B. monoklonale Antikörper gegen das ko-stimulatorische Oberflächenmolekül, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten des Oberflächenmoleküls bereitzustellen.

In einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, charakterisiert dadurch, daß a) das Polypeptid auf

aktivierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) oder dendritischen Zellen vorkommt, und b) das Polypeptid ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa (Kilodalton) hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-PAGE.

Das erfindungsgemäße Polypeptid (nachstehend auch 8F4-Molekül oder 8F4 genannt) wird erst nach Aktivierung der T-Lymphozyten exprimiert, und zwar sowohl auf CD4⁺- wie auch auf CD8⁺-T-Zellen. In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE weist das 8F4-Molekül ein Molekulargewicht zwischen etwa 55 und 60 kDa (Kilodalton) auf. Das 8F4-Molekül ist aus zwei Peptidketten zusammengesetzt, wobei die beiden Peptidketten in einer reduzierenden SDS-PAGE ein Molekulargewicht von etwa 27 und etwa 29 kDa aufweisen. Histologisch kann man das 8F4-Antigen auf aktivierten T-Lymphozyten im lymphatischen Gewebe der Tonsillen und Lymphknoten eindeutig nachweisen, insbesondere in Keimzentren, dem Ort der Interaktion von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten bei der Generierung von Antikörpern. *Ex vivo* isolierte tonsilläre T-Zellen sind zu etwa 50-80% positiv für das 8F4-Antigen und weisen Zeichen einer fortgeschrittenen Aktivierung auf. Das 8F4-Molekül ist auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen nicht nachweisbar.

Eine wichtige biologische Aktivität des 8F4-Moleküls ist seine ko-stimulierende Aktivität von T-Lymphozyten. Die ko-stimulierende Aktivität kann bestimmt werden nach Linsley, et al., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. Die ko-stimulierende Aktivität des 8F4-Moleküls ähnelt der ko-stimulierenden Aktivität des CD28-Moleküls, welches als zentrales Verstärkungselement der Antigen-Erkennung durch das Immunsystem identifiziert worden ist. Das 8F4-Molekül unterscheidet sich jedoch in vielen Aspekten von CD28. So muß die Expression des 8F4-Moleküls auf der Oberfläche der T-Zellen erst induziert werden, während CD28 konstitutiv exprimiert wird. Auch in der Funktion sind deutliche Unterschiede nachweisbar: Die Ko-Stimulation über CD28 führt zur Überexpression zahlreicher Lymphokine, u.a. des Interleukin-2 (IL-2). Auch die Ko-Stimulation über 8F4 führt zu einer verstärkten Sekretion von Lymphokinen, nicht jedoch des IL-2. Somit unterscheidet sich die ko-stimulatorische Aktivität des 8F4-Moleküls von der Aktivität des CD28-Moleküls. Da die Stimulation über 8F4 nicht alle Zytokin-Gene anschaltet, ist eine Ko-Stimulation über 8F4 *in vivo* vorteilhaft, z.B. gegenüber

einer Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor. Auch unterscheidet sich die Induktion, die Expression, der Expressionsort und die Funktion des 8F4-Moleküls von allen anderen bekannten ko-stimulatorisch wirksamen Molekülen.

- 5 Bei dem erfindungsgemäßen 8F4-Molekül handelt es sich um ein neues Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist. Die Expression *in vivo* deutet u.a. auf eine wesentliche Beteiligung des 8F4-Moleküls an der Kooperation von T-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems wie B-Zellen oder dendritischen Zellen im Rahmen der humoralen und zellulären Immunabwehr gegen
- 10 Viren und Bakterien hin.

Nach Expression hat das 8F4-Molekül *in vitro* eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf verschiedene Funktionen der T-Lymphozyten:

- 15 1. Deutliche Verstärkung der Proliferation von T-Lymphozyten.
 2. Deutliche Verstärkung der Synthese bestimmter Zytokine durch die T-Lymphozyten.
 3. Stark erhöhte Expression von Steuerungs-Molekülen, z.B. Oberflächenmoleküle und Zytokine, auf und in T-Lymphozyten.
 4. Deutliche Verbesserung der T-Zell-induzierten Antikörper-Bildung (IgM und IgG) durch B-
- 20 Zellen

In einer zweiten Ausführungsform betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können auf übliche Weise nach dem von Milstein und Köhler, *Nature* 256 (1975), 495-497, beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Insbesondere können die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper hergestellt werden, indem Mäuse mit T-Zellen, die *in vitro* mit Phorbolmyristataacetat (PMA) und Ionomycin ("2-Signal-System") für 24 h aktiviert worden sind, immunisiert werden. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse werden mit Myelom-Zellen fusioniert. 8F4-spezifische monoklonale Antikörper werden dadurch identifiziert, daß sie 2-Signal-aktivierte, jedoch nicht ruhende T-

25 Lymphozyten erkennen. Auch färben 8F4-spezifischen Antikörper mit einem Signal (entweder PMA oder Ionomycin) stimulierte T-Zellen in einem auf übliche Weise durchgeführten Nachweisverfahren nicht an. 8F4-spezifische Antikörper ergeben ein typisches Anfärbemuster von tonsillären T-Zellen und erkennen ein Antigen von etwa 55 bis 60 kDa in einer nicht

30 reduzierenden SDS-PAGE und von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa in einer reduzierenden SDS-

PAGE auf aktivierten T-Lymphozyten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Hybridomzellen, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper herstellen.

5

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, als Arzneimittel. Besonders bevorzugt ist Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, natürlicher oder synthetischer Liganden, Agonisten oder Antagonisten des 8F4-Moleküls. Diese Substanzen können als Arzneimittel verwendet werden, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Die Blockade der Interaktion des 8F4-Antigens mit seinem Rezeptor verbessert z.B. die Verhinderung der Organabstoßung, da eine solche Blockade nur bereits aktivierte T-Lymphozyten betrifft.

15

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids als Arzneimittel. Insbesondere kann das erfindungsgemäße Polypeptid, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV-oder HBV-Infektionen verwendet werden.

20

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann ebenfalls auf übliche Weise in Zellen eingeführt werden, so daß diese Zellen das Polypeptid z.B. konstitutiv exprimieren. Z.B. kann die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz oder ein Vektor, umfassend die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz, z.B. die cDNA oder genomische DNA, Promotoren, Enhancer und andere für die Expression der Nukleinsäuresequenz benötigten Elemente, in eine Zelle eingeschleust werden. Ferner kann das erfindungsgemäße Polypeptid z.B. mittels Liposomen in Zellen eingeführt werden, die das Polypeptid danach auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Erfindungsgemäß können diese Zellen als Arzneimittel verwendet werden, insbesondere zur Wiederherstellung der Dysregulation des menschlichen Immunsystems, wie sie im Rahmen zahlreicher chronischer Infektionserkrankungen auftritt, z.B. im Rahmen von AIDS, Asthmaerkrankungen oder bei chronischen viralen Hepatitiden (z.B. HCV, HBV), oder zur Stimulation des Immunsystems *in vitro* oder *in vivo*, wie z.B. für die Therapie von

25

30

Krebserkrankungen verwendet werden.

In einer weiteren Ausführungsform werden Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist verwendet, wobei die Substanzen insbesondere einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen. Zur Diagnose kann z.B. ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet werden. Die Durchführung dieser Nachweise sind dem Fachmann bekannt.

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung:

Fig. 1 zeigt das Ergebnis einer Immunpräzipitation des 8F4-Antigens aus aktivierten humanen T-Zellen. (a) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 12% Polyacrylamidgel (PAA-Gel)) reduzierend, (b) SDS-PAGE (10% PAA-Gel) nicht reduzierend. Angegeben sind die Bedingungen zur Elution des Antigens von der 8F4-Matrix. "SDS" bedeutet Natriumdodecylsulfat; "DTT" bedeutet Dithiothreitol, "Mr" bedeutet Molekulargewicht und "kDa" bedeutet Kilodalton.

Fig. 2a zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen ist in Klammern angegeben. "PMA" bedeutet Phorbolmyristatacetat; "PHA" bedeutet Phytohaemagglutinin; "OKT3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD3; "MLR" bedeutet gemischte Lymphocytenreaktion (engl.: *mixed lymphocyte reaction*); "mAK 9.3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD28; "SEB" bedeutet Staphylokokken Enterotoxin B.

Fig. 2b zeigt das Ergebnis einer Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin in einer Durchflußzytometrie. Aufgetragen ist die Immunfluoreszenz (log) gegen die Zellzahl.

Fig. 3 zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind. "bio" bedeutet biotinylierter Antikörper.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer histochemischen Untersuchung zur Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

Fig. 5 zeigt das Ergebnis einer Expressions-Analyse von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen in einer Durchflußzytometrie. "bioPE" bedeutet biotinylierter Antikörper und Streptavidin-Phycoerythrin Sekundärreagenz.

Fig. 6 zeigt die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern (CD69, CD45) in einer Durchflußzytometrie.

Fig. 7 zeigt schematisch die verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4. Offene Kreise (O) stehen für 8F4 Antikörper; Dreiecke (◆) stehen für unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps; ausgefüllte Kreise (●) stehen für anti-CD28-Antikörper-9.3.

Fig. 8 zeigt einen schematischen Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28. "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper; "ATAC" bedeutet "Activation induced T cell derived And Chemokine related"; "cpm" bedeutet radioaktive Zerfälle pro Minute.

Fig. 9 zeigt schematisch die Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen. "ng" bedeutet Nannogramm; "ml" bedeutet Milliliter; "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper.

Fig. 10 zeigt schematisch die Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

Beispiel 1: Generierung des 8F4-Antikörpers

Balb/c Mäuse wurden mit humanen T-Zellen immunisiert, welche vorher für 24 h mit 33 ng/ml des Phorbolesters Phorbolmyristatacetat (PMA), (Sigma, Deisenhofen), und mit 200 ng/ml der Ca^{2+} -Ionophore Ionomycin (Sigma, Deisenhofen) aktiviert worden sind (sogenannte "2-Signal-

Aktivierung"). Nach dreimaligem Boostern wurden die Milzzellen der Mäuse mit dem Myelom P3X63Ag8.653 (ATCC Nr.CRL-1580) fusioniert und Antikörper-sezernierende Hybridome nach Standardmethoden generiert; vgl. Peters und Baumgarten, *Monoclonal Antibodies*. Springer, Heidelberg, 1992. Das Durchmustern der erhaltenen Antikörper erfolgte auf aktivierten versus ruhenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie. Aktivierte ("2-Signal-Aktivierung") und ruhende T-Zellen wurden mit dem Hybridomüberstand inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper markiert; vgl. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*. Wiley-Liss, New York, 1995. Nur die Antikörper, welche Moleküle erkannten, die ausschließlich durch PMA und die Ca^{2+} -Ionophore Ionomycin auf der T-Zell-Oberfläche induziert wurden, jedoch nicht durch eines der Agenzien alleine ("2-Signal-Moleküle") wurden für eine weitere Reinigung ausgewählt. Die erhaltenen Antikörper wurden in der Durchflußzytometrie auf Ähnlichkeit bzw. Verschiedenheit zu bekannten Antikörpern gegen Aktivierungsmoleküle (vgl. Tabelle 1) auf T-Zellen untersucht. Kriterien waren hierbei neben der schon oben erwähnten "2 Signal-Abhängigkeit" die Kinetik der Induktion auf stimulierten T-Zellen und die Expression auf verschiedenen Zelllinien.

Beispiel 2: Immunpräzipitation des 8F4-Antigens

Oberflächenmoleküle von aktivierten humanen T-Zellen wurden mit ^{125}I nach Standardmethoden iodiniert und mit dem Antikörper 8F4 nach Standardmethoden immunpräzipitiert; vgl. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principle and Practice*. Academic Press, London, 1996. Für die Immunpräzipitation wurde der Antikörper nach Schneider et al., *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), 10766-10769, an Protein G (Pharmacia, Freiburg) gekoppelt (8F4-Matrix). Das Waschen der Matrix erfolgte nach Schneider et al., siehe vorstehend. Das immunpräzipitierte 8F4-Molekül wurde auf übliche Weise in der SDS-PAGE (nicht reduziert und reduziert) auf seine molekulare Masse analysiert; Goding, siehe vorstehend.

Beispiel 3. Durchflußzytometrie

Die Analyse der 8F4-tragenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie erfolgte nach Standardmethoden; vgl. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*. Wiley-Liss, New York, 1995.

Ausführungsbeispiel 3.1: Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4^+ -T-Zellen.

CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Agenzien in üblicher Weise stimuliert und auf Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie nach üblichem Verfahren untersucht. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen betrug mit den verschiedenen Agenzien zwischen 24 Stunden und 144 Stunden. Aktivierungsmodi: Phorbolmyristatacetat (PMA; 33 ng/ml), Ionomycin (200 ng/ml), Phytohaemagglutinin (PHA 1,5 mg/ml), OKT3 (monoklonaler Antikörper gegen CD3), gemischte Lymphocytenreaktion (MLR, "mixed lymphocyte reaction" zwischen 50 000 CD4⁺-T-Zellen und 100 000 B-Zellen), mAk 9.3 (monoklonaler Antikörper gegen CD28), Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 0,1 ng/ml). Die Auswertung ergab, daß verschiedene Stimuli geeignet sind, das 8F4-Molekül auf T-Zellen zu induzieren, jedoch in unterschiedlicher Expressionsdichte. Am potentesten sind neben den stark wirksamen pharmakologischen Agenzien PMA und Ionomycin solche Stimuli, die eine ko-stimulatorische Situation darstellen, wie z.B. akzessorische Zellen in der MLR oder der ko-stimulierende mAk 9.3.

Ausführungsbeispiel 3.2: Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4⁺-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin.

CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit PMA (33 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) in üblicher Weise stimuliert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie in üblicher Weise untersucht. Das Molekül ist bereits nach vier Stunden auf der Oberfläche detektierbar, gehört also zur Klasse der relativ frühen Aktivierungsantigene. Auch nach 48 Stunden wird das Antigen noch gut exprimiert.

Ausführungsbeispiel 3.3: Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind.

50 000 CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit 100 000 allogenen tonsillären B-Zellen für 6 Tage ko-kultiviert (37°C, 5,2% CO₂, 200 µl RPMI 1640 mit 10% FCS in 96-Well-Rundbodenplatten) und danach auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie untersucht. Zu Beginn der Kultivierung wurden verschiedene Antikörper (anti-CD80, anti-CD86, anti-MHCII; alle 10 mg/ml) der Kultur hinzugefügt, um die Abhängigkeit der 8F4-Induktion von diesen Molekülen zu überprüfen. Die Expression von 8F4 läßt sich nur durch Blockade der CD86/CD28-Interaktion blockieren, nicht jedoch durch Blockade von CD80. Der Blockade-

Effekt ist hierbei noch stärker als die Blockade von MHCII (Positivkontrolle).

Ausführungsbeispiel 3.4: Expression von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen.

- 5 B-Zellen bzw. T-Zellen aus tonsillärem Gewebe von verschiedenen Quellen wurden auf übliche Weise gereinigt und in der Durchflußzytometrie auf die Expression des 8F4-Moleküls untersucht. Während auf B-Zellen das Signal nicht eindeutig signifikant war, exprimierten etwa 50-80% der tonsillären T-Zellen das 8F4-Molekül in unterschiedlicher Dichte. Es lassen sich hierbei zwei Populationen unterschiedlich hoher Fluoreszenz (8F4-"high" bzw. -"low") erkennen, deren
- 10 Ausprägung bei den verschiedenen Tonsillen unterschiedlich ist. So weist z.B. Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"low"- und andere Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"high"-Population auf.

Ausführungsbeispiel 3.5: Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern.

- 15 Aus humanen Tonsillen gereinigte T-Zellen wurden in der 2-Farben-Durchflußzytometrie auf die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern analysiert. In Tonsillen wird 8F4 ko-exprimiert mit CD69 wie auch mit Varianten des CD45-Moleküls. Hierbei sind die 8F4-"high"-Zellen eindeutig mit einer CD45RO-Expression korreliert, während die 8F4-negativen Zellen den Phänotyp CD45RA tragen. CD45RA wird hauptsächlich von sogenannten "naiven" T-
- 20 Zellen exprimiert, wohingegen CD45RO mit einer Effektorzellfunktion assoziiert ist. Es handelt sich also bei den 8F4⁺-Zellen hauptsächlich um "reife" T-Zellen. CD45RO und CD45RA sind Isoformen von CD45.

Beispiel 4: Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille

- 25 Tonsilläres Gewebe in Gefrierschnitten wurde mit dem 8F4-Antikörper in der APAAP-Technik (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) nach Standardverfahren angefärbt. 8F4⁺-Zellen wurden vorzugsweise im Keimzentrum der Tonsillen vorgefunden, aber z. T. auch in der T-Zell-Zone der Tonsillen.

30

Beispiel 5: Ko-Stimulation von T-Lymphozyten

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT3 (verschiedene Verdünnungen

eines Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 mg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle wurden der OKM1 Antikörper oder der 2A11 Antikörper (beide 2 mg/ml) verwendet.

5 Ausführungsbeispiel 5.1: Verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Gereinigte CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers OKT3 aktiviert und gleichzeitig mit dem 8F4-Antikörper oder
10 einem unspezifischen Antikörper gleichen Isotyps ko-stimuliert. Als Vergleich wurde die Kostimulation mit dem anti-CD28-Antikörper-9.3, einem der stärksten bekannten ko-stimulatorischen Antikörper, durchgeführt. Selbst bei optimaler Stimulation über CD3 ist sowohl mit dem mAk 8F4 als auch mit mAk 9.3 noch ein ko-stimulatorischer Effekt zu sehen. Im suboptimalen OKT3-Bereich, d.h. dem Bereich, in dem ohne Ko-Stimulation keine volle T-
15 Zellaktivierung mehr erzielt werden kann, können beide Antikörper die Expression anderer Aktivierungsantigene um den Faktor 4 bis 100 steigern, wobei die Wirkung des anti-CD28-Antikörpers auch noch bei sehr hohen OKT3-Verdünnungen sichtbar wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei sehr schwacher OKT3-Stimulation das 8F4-Antigen nicht mehr auf die Zelloberfläche gebracht und somit auch nicht vom mAk 8F4 kreuzvernetzt werden kann.

20

Ausführungsbeispiel 5.2: Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28.

Gereinigte CD8⁺-T-Zellen wurden für 51 h mit einer suboptimalen Konzentration des
25 monoklonalen Antikörpers OKT3 stimuliert. Als Ko-Stimulatoren wurden Antikörper 8F4, Antikörper 9.3 (anti-CD28) und Isotypkontrollen eingesetzt (jeweils 2 mg/ml). Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurde die Proliferationsrate der T-Zellen durch ³H-Thymidin-Einbau bestimmt. In Parallelkulturen wurde der Überstand entfernt und die Konzentration der Zytokine ATAC/Lymphotactin und IL-2 bestimmt. Bezüglich der IL-2-Synthese unterscheiden sich 8F4
30 und CD28 sehr stark voneinander. CD28-Ko-Stimulation führt, wie auch im Stand der Technik beschrieben (Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404), zu einer sehr starken IL-2 Sekretion. Mit 8F4 hingegen liegt die IL-2 Produktion unterhalb der Nachweisgrenze. Die Proliferation ist jedoch in beiden Ansätzen vergleichbar, das autokrine Wachstum der T-Zellen muß also bei 8F4-Ko-Stimulation auf andere Faktoren zurückgeführt

werden. Auch in bezug auf die Sekretion des Lymphokins ATAC unterscheiden sich die beiden Antikörper in der ko-stimulatorischen Wirkung kaum.

Beispiel 6: Bestimmung der von B-Zellen synthetisierten Immunglobuline nach Interaktion mit 8F4 ko-stimulierten T-Zellen

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 mg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT 3 (1:500 bis 1:80 000 Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 mg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle wurde der OKM1-Antikörper oder der 2A11-Antikörper verwendet. In einigen Experimenten wurde zum Vergleich eine Ko-Stimulation mit einem CD28-spezifischen Antikörper ("9.3") durchgeführt; vgl. Hara et al., *Journal of Experimental Medicine* 161 (1985), 1513-1524. In die so vorbehandelten Kulturplatten wurden pro well 50 000 gereinigte (Magnetobeads, Dynal, Hamburg) CD4⁺-T-Zellen (>95% Reinheit) aus dem peripheren Blut und 25 000 allogene tonsilläre B-Zellen (negativ- Selektion durch T-Zell-Rosettierung mit Schafserythrocyten, 96% Reinheit) pipettiert und für 8 Tage ko-kultiviert. Nach dieser Zeitdauer wurde der Überstand entnommen und auf die Konzentration sezernierter Immunglobuline vom IgM- und IgG-Typ im ELISA auf übliche Weise analysiert; vgl. Nishioka and Lipsky, *Journal of Immunology* 153 (1994), 1027-1036.

Ausführungsbeispiel 6.1: Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen.

Gereinigte CD4⁺-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden für 8 Tage mit allogenen B-Zellen aus Tonsillen in üblicher Weise ko-kultiviert. Bei einer suboptimalen Stimulation der T-Zellen mit dem OKT3-Antikörper verstärkt die Ko-Stimulation der T-Zellen durch 8F4 die Sekretion der IgM- und IgG-Immunglobuline um den Faktor 40.

Beispiel 7: Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

Periphere T-Zellen (über Nylonwolladhärenz in üblicher Weise aufgereinigt) wurden für 20 h mit PHA (1.5 mg/ml) stimuliert und über 6 Tage mit IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch OKT3 mit und ohne Ko-Stimulation durch mAk 8F4 (2 mg/ml) restimuliert. Die Apoptose wurde durch Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid in der Durchflußzytometrie (FACS)

bestimmt. Bei suboptimaler Stimulation über den T-Zellrezeptor-Komplex kann Ko-Stimulation über 8F4 den Anteil apoptotischer Zellen um den Faktor 4 senken.

Tab.1:

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper (Klon), deren Herkunftsquelle (Quelle), die Spezifität gegen ihr jeweiliges Antigen (Spezifität) und gegebenenfalls ihre Markierung (Label) wider.

Spezifität	Label	Isotyp	Klon	Quelle
CD3	Cy-Chrome	IgG1	UCHT1	Pharmingen, Hamburg
CD3	-	IgG2a	OKT3	ATCC CRL-8001
CD11b	-	IgG2b	OKM1	ATCC CRL-8026
CD25	FITC	IgG2a	B1.49.9	Immunotech, Hamburg
CD28	-	IgG2a	9.3	Immunex Corp., Seattle, USA
CD45RA	Cy-Chrome	IgG2b	HI100	Pharmingen, Hamburg
CD45RO	FITC	IgG2a	UCHL1	Immunotech, Hamburg
CD69	FITC	IgG1	FN50	Pharmingen, Hamburg
CD80	-	IgG1	L307.4	Becton Dickinson, Heidelberg
CD86	-	IgG2b	IT2.2	Pharmingen, Hamburg
CD154	FITC	IgG1	TRAP-1	Hybridom ¹
MHCII	-	IgG2a	L243	ATCC HB-55
8F4	-	IgG1	8F4	Hybridom ¹
8F4	Biotin	IgG1	8F4	Hybridom ¹
Isotyp IgG1	-	IgG1	2A11	Hybridom ^{1,2}
Isotyp IgG1	FITC	IgG1	2A11	Hybridom ^{1,2}
Isotyp IgG1	Biotin	IgG1	ASA-1	Hybridom ¹

¹ Die Hybridomzelllinie wurde auf übliche Weise generiert, der Antikörper aufgereinigt und gegebenenfalls markiert.

² gerichtet gegen ein synthetisches Peptid

- 15 Die in den Beispielen verwendeten Antisera und Sekundärreagenzien wurden bezogen von: Ziege-anti-Maus-Ig, FITC-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Streptavidin, PE-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Kaninchen-anti-Maus-Ig-Fraktion, von Sigma, Deisenhofen.

Patentansprüche

1. Ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, dadurch charakterisiert, daß

5 a) das Polypeptid auf aktivierten $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen oder dendritischen Zellen vorkommt, und

10 b) das Polypeptid ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.

15 2. Monoklonaler Antikörper, der das Polypeptid nach Anspruch 1 spezifisch erkennt.

3. Monoklonaler Antikörper, der das Polypeptid nach Anspruch 1 spezifisch erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß B-Zellen von Mäusen, die mit PMA und der Ca^{2+} -Ionophore Ionomycin aktivierten humanen T-Lymphozyten immunisiert werden, mit einer Myelomzelllinie zu
20 einem Antikörper-sezernierenden Hybridom fusioniert werden und die monoklonalen Antikörper in der Durchflußzytometrie auf 2-Signal-Molekül-aktivierte gegen ruhende T-Zellen gereinigt werden.

25 4. Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 2 oder 3 erzeugt.

5. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach Anspruch 1 hemmen, als Arzneimittel.

30 6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.

7. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach Anspruch 1 hemmen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen.

8. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 1 als Arzneimittel.
9. Verwendung des Polypeptids nach Anspruch 1 zur Herstellung von Arzneimitteln zur
5 Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen
Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
10. Verwendung von Zellen, enthaltend das Polypeptid nach Anspruch 1, als Arzneimittel.
- 10 11. Verwendung von Zellen nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur
Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen
Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
12. Verwendung von Substanzen, die das Polypeptid nach Anspruch 1 spezifisch erkennen,
15 zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.
13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper,
natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.
- 20 14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, wobei zur Diagnose ein ELISA-Nachweis,
Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische
Anfärbung verwendet wird.

1/11

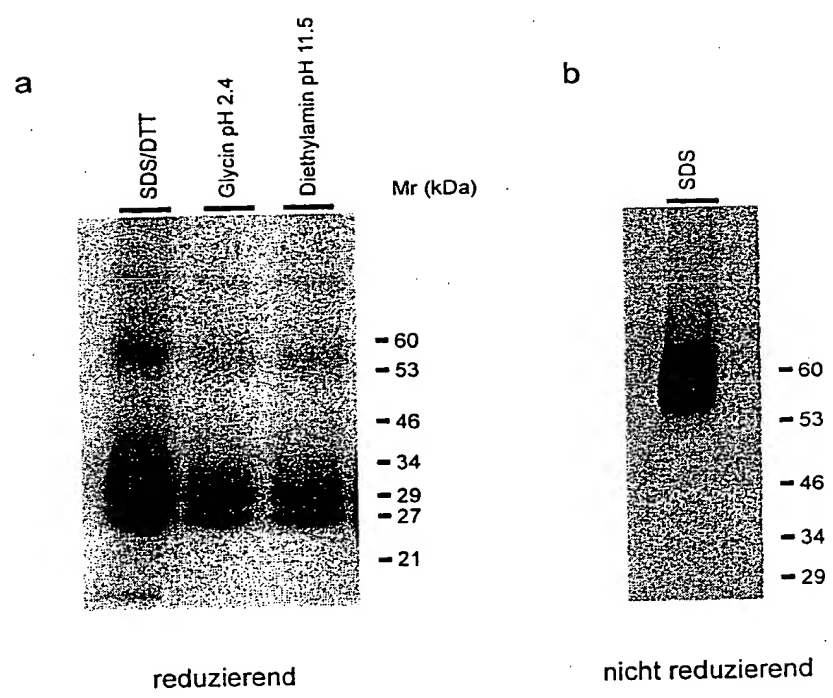
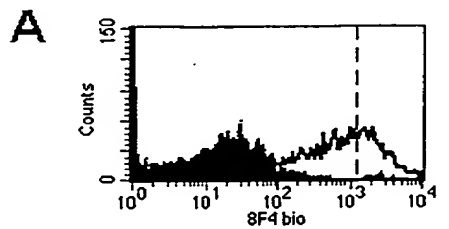
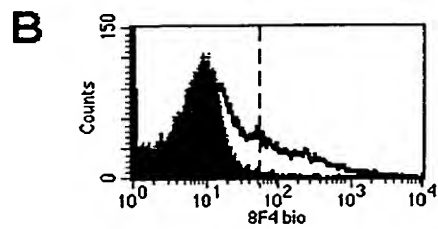


Fig. 1

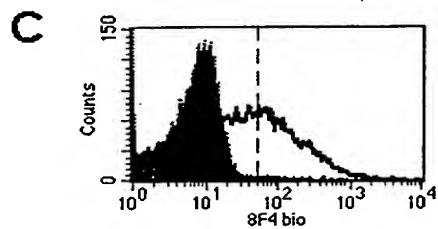
2/11



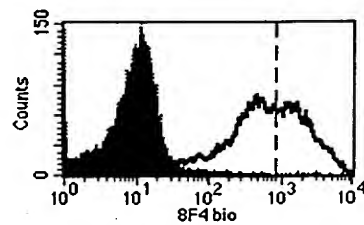
PMA + Ionomycin (24 h)



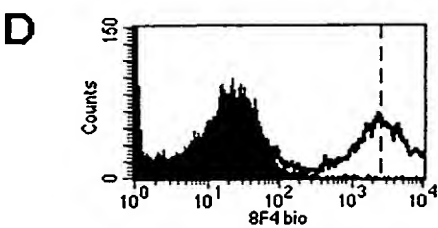
PHA (144 h)



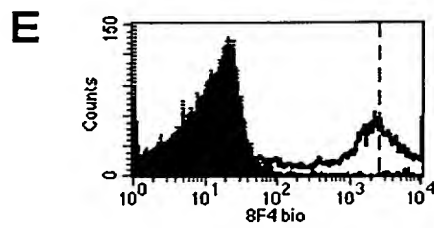
OKT3 (24 h)



OKT3 + mAK 9.3 (24 h)



MLR (6 Tage)



MLR + SEB (4 Tage)

Fig. 2a

3/11

22

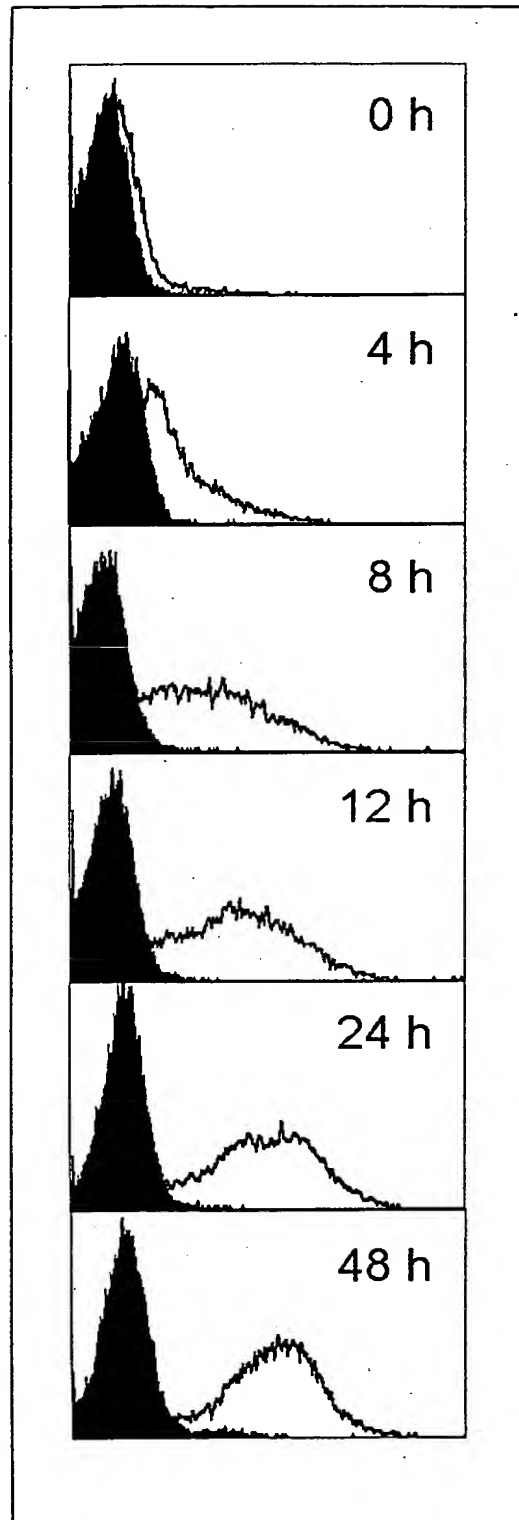


Fig. 26

4/11

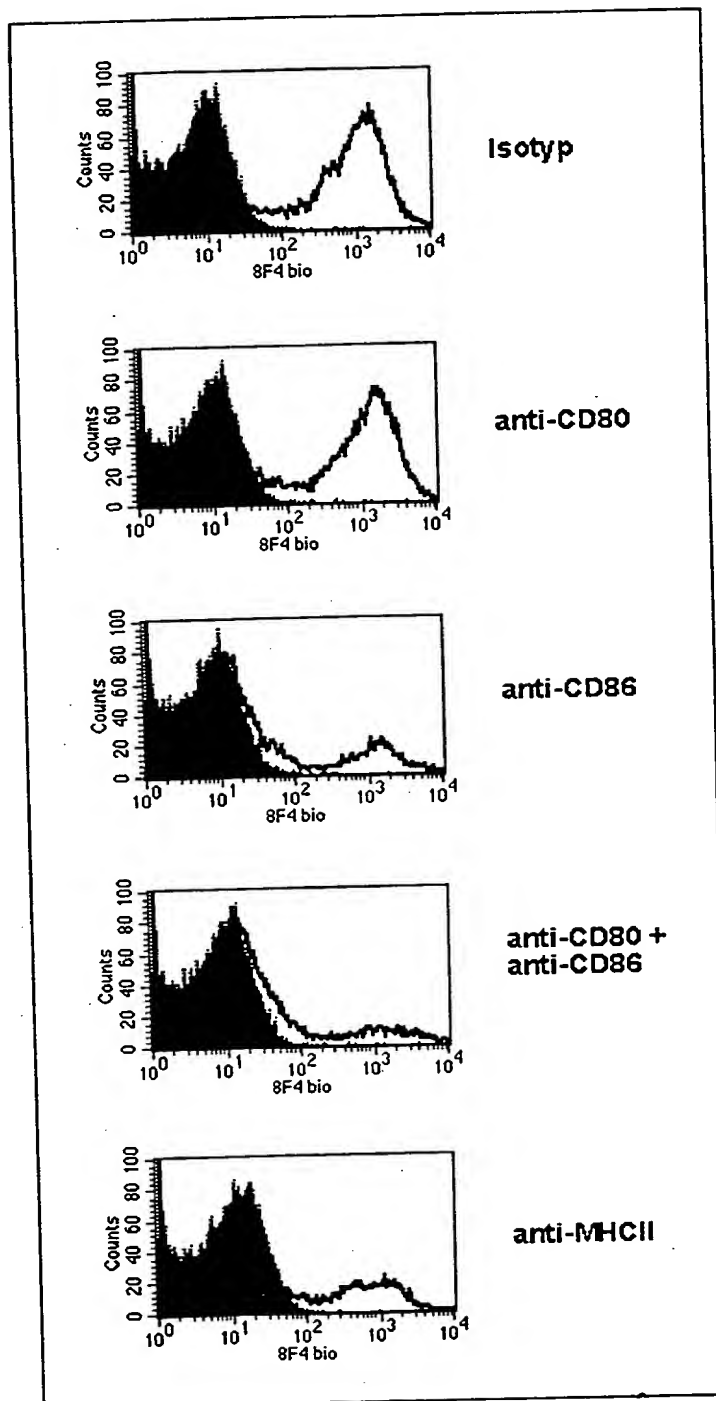


Fig. 3

5/11

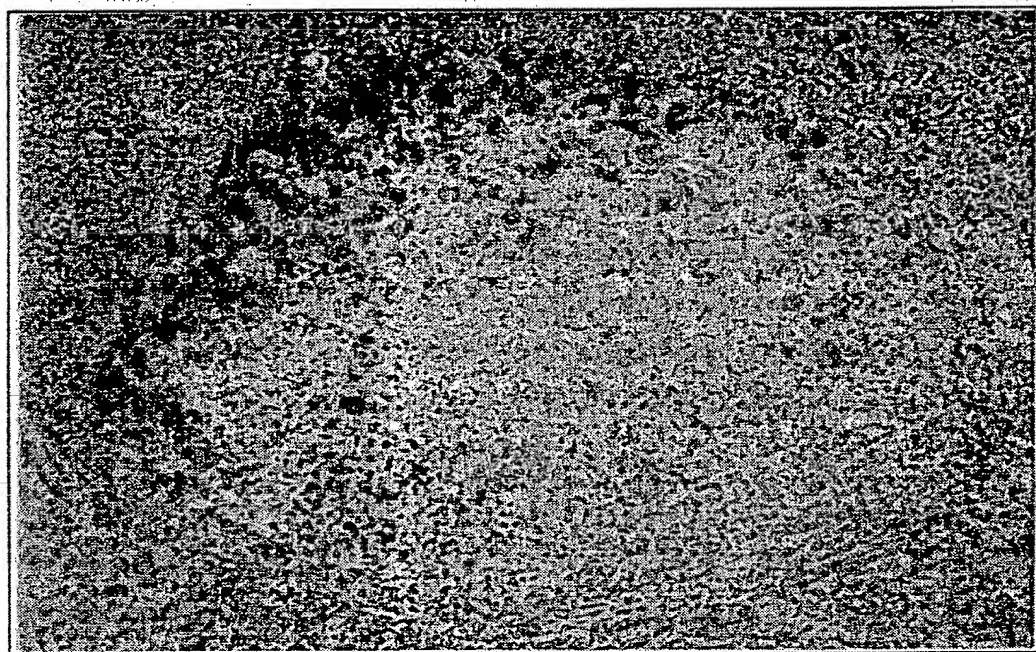
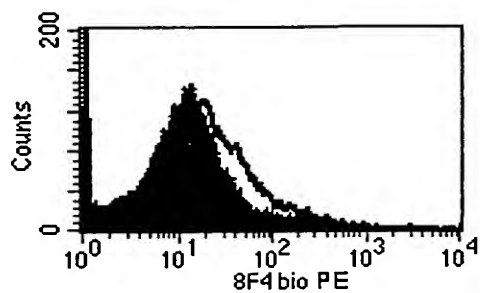


Fig. 4

6/11

A tonsilläre B-Zellen



B tonsilläre T-Zellen

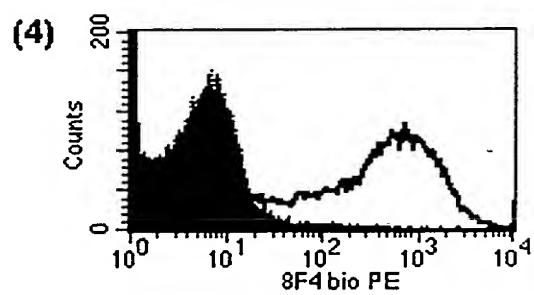
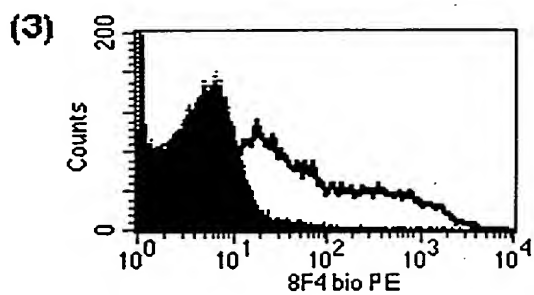
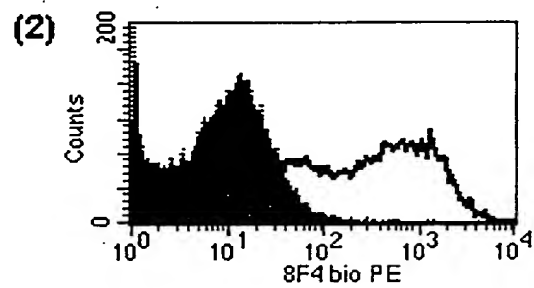
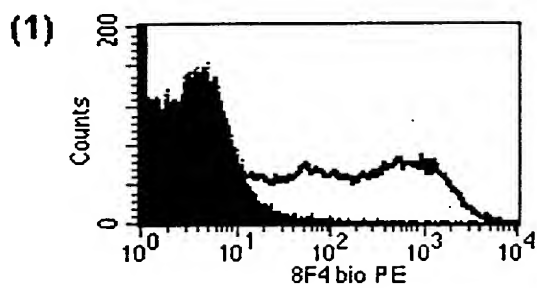


Fig. 5

7/11

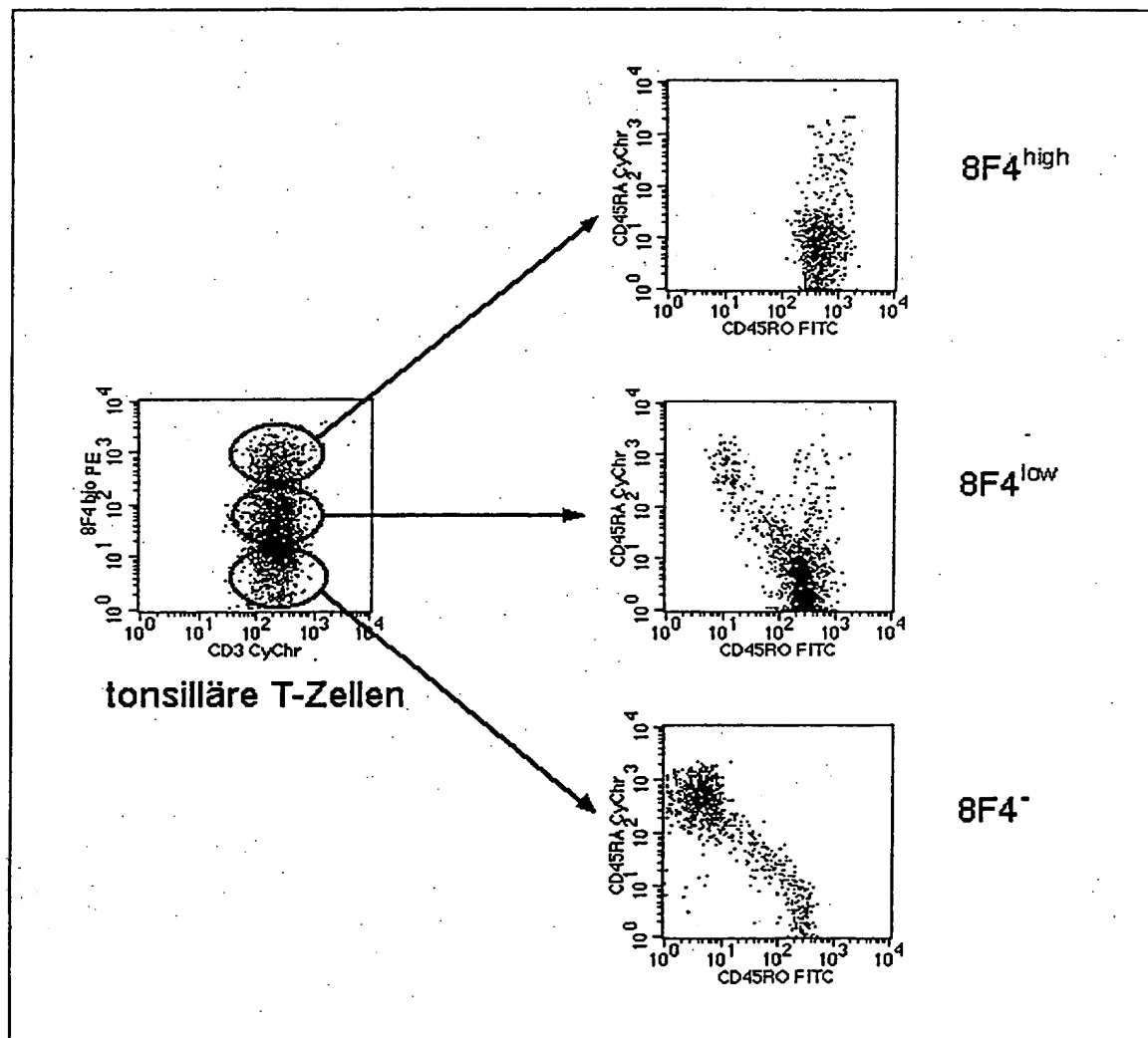
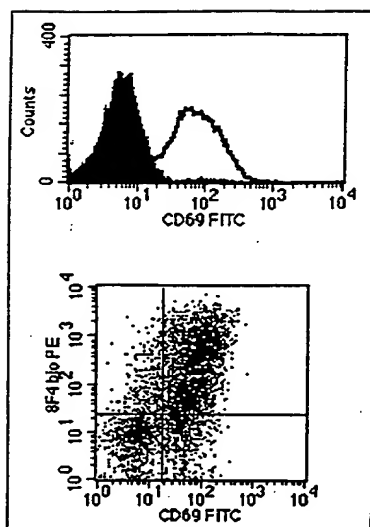


Fig. 6

8/11

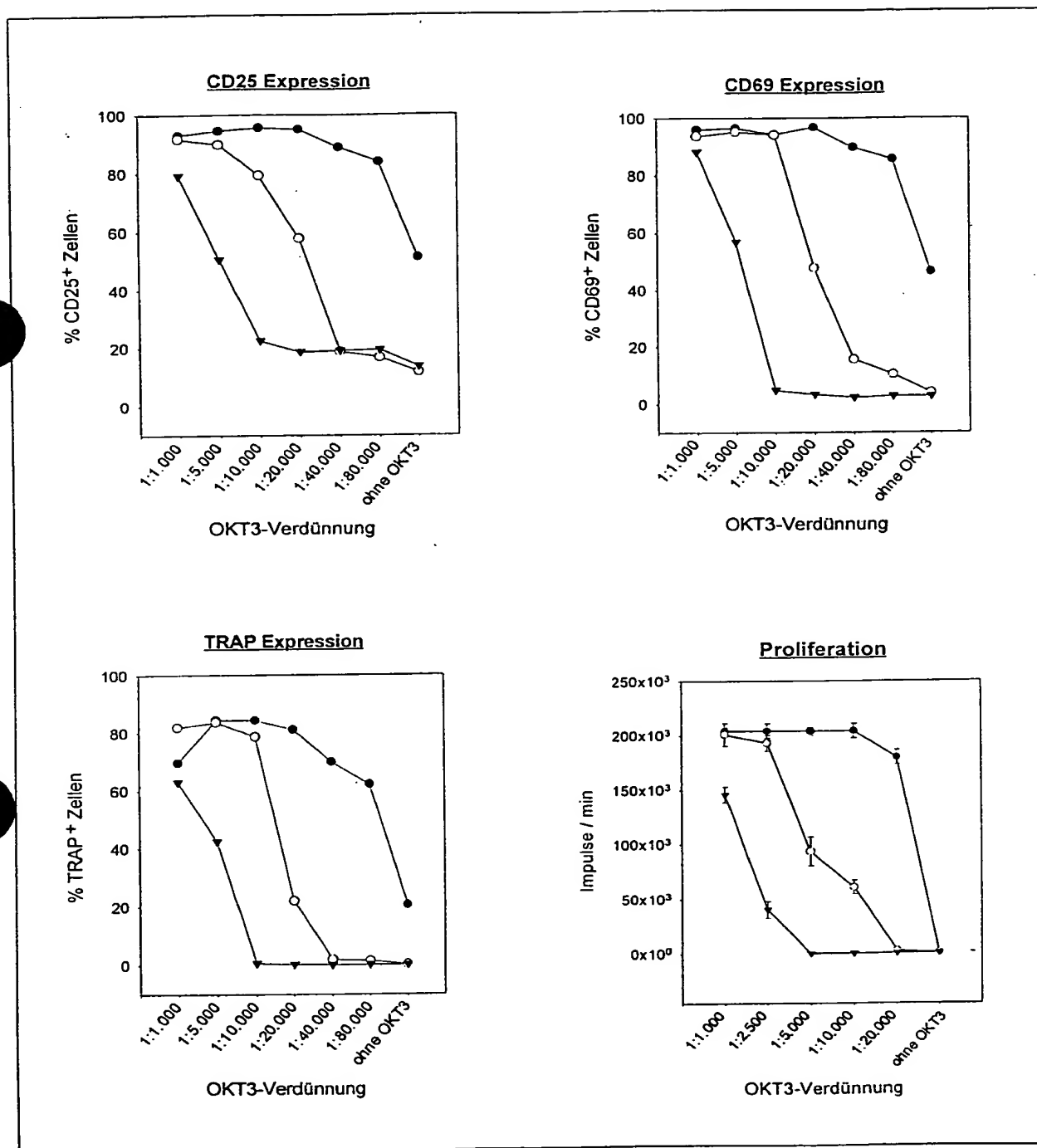


Fig. 7

9/11

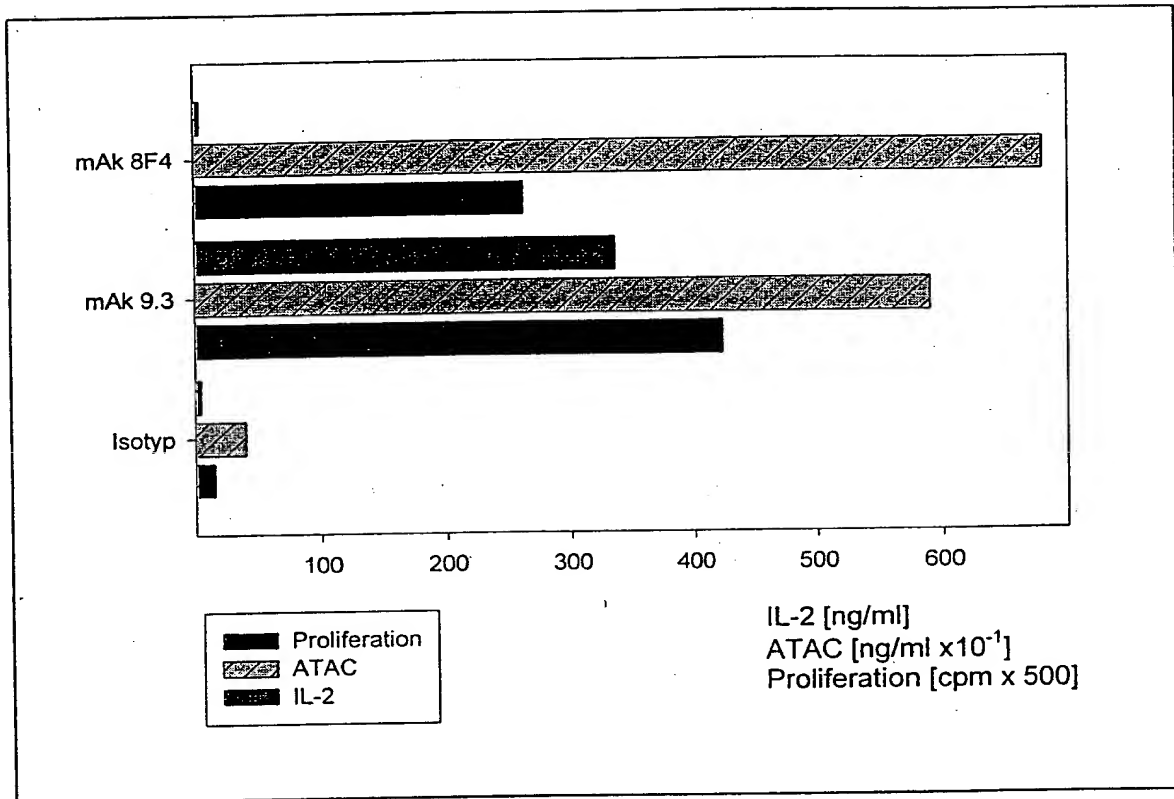


Fig. 8

10/11

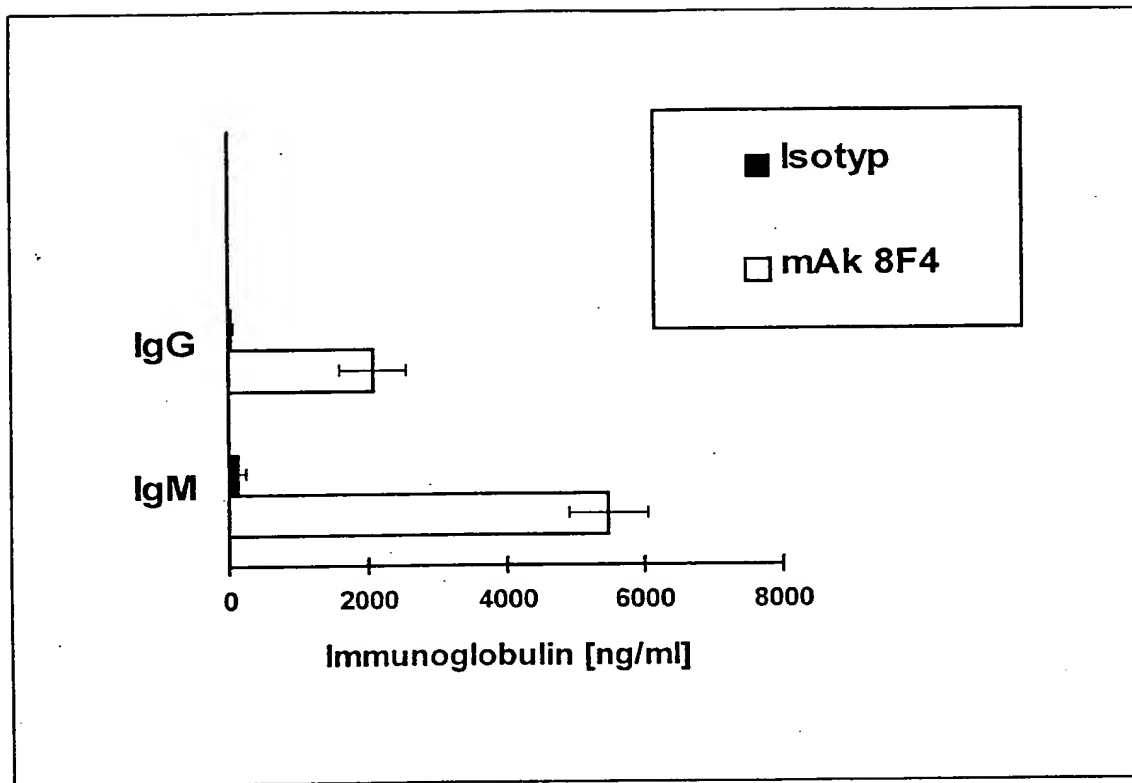


Fig. 9

M/11

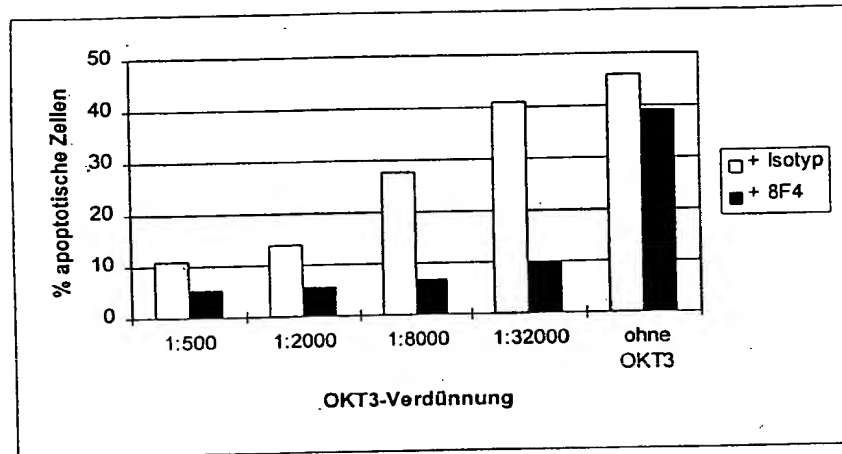


Fig. 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)